

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 633 310**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **88 08536**

(51) Int Cl<sup>4</sup> : C 12 Q 1/88; C 12 N 15/00 // G 01 N 33/531,  
33/569.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 24 juin 1988.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 52 du 29 décembre 1989.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(71) Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR, Fondation recon-  
nue d'utilité publique. — FR.*

(72) Inventeur(s) : Daniel Larzul ; Jean-Luc Guesdon ; Jean-  
Pierre Gerlier.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Orès.

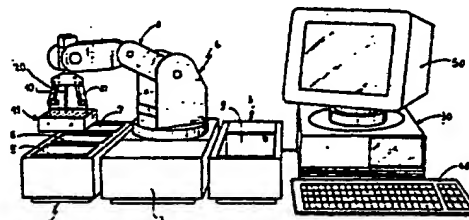
(54) Appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique en plusieurs étapes successives, notamment pour l'amplification enzymatique de séquences d'acides nucléiques.

(57) Appareil d'exécution automatique, répétée d'un cycle ther-  
mique en plusieurs étapes successives de traitement d'une  
pluralité d'échantillons biologiques.

L'appareil comporte :

- un premier bloc calorifugé 1,
- une pluralité de cuves thermostatiques indépendantes 5, 6, 7 ménagées dans ce bloc calorifugé 1,
- une pluralité de portoirs 11 de support d'une pluralité de tubes contenant les échantillons, chaque portoir étant destiné à être immergé successivement dans les cuves thermostatiques,
- un robot 4 de transfert successif des portoirs 11,
- un dispositif de régulation électronique de la température de chaque cuve 5, 6, 7,
- un ordinateur de commande du robot et du dispositif de régulation électronique.

Application au traitement thermique cyclique répété d'échan-  
tillons biologiques, et notamment à l'amplification enzymatique  
*in vitro* de séquences d'acides nucléiques.



FR 2 633 310 - A1

D

La présente invention est relative à un appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique en plusieurs étapes successives pour le traitement d'une pluralité d'échantillons biologiques, notamment pour l'amplification enzymatique in vitro de séquences d'acides nucléiques.

Un procédé décrit par SAIKI et al. (cf. SCIENCE, vol. 230, pages 1350-1354, 20 décembre 1985) vise à amplifier au moins une séquence spécifique d'acides nucléiques ou d'un mélange de ceux-ci en utilisant des amorces (primers), des nucléotides triphosphates et un agent de polymérisation, tel que l'ADN polymérase. Cette méthode d'amplification enzymatique in vitro est connue sous le nom de technique PCR (Polymerase Chain Reaction) et est très utile notamment pour effectuer des tests chimiques très importants, tels que le diagnostic prénatal de l'anémie à hématies falciformes ou le diagnostic du virus du SIDA. Dans ces cas, l'ADN amplifié par PCR est détecté à l'aide d'une sonde nucléique complémentaire des séquences d'ADN amplifiées.

De façon plus précise, cette technique consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN double brin à l'aide de l'enzyme ADN polymérase, permettant sa synthèse (cf. la figure 1 annexée à cette description, qui illustre schématiquement deux cycles d'amplification). Pour cela, il est nécessaire d'ajouter au milieu réactionnel deux oligonucléotides (P1 et P2) spécifiques d'une partie du fragment d'ADN à amplifier. Les deux oligonucléotides sont complémentaires des brins opposés : P1 est complémentaire du brin (+) et P2 est complémentaire du brin (-). Chaque oligonucléotide, une fois hybridé avec son brin complémentaire, servira d'amorce (ou primer) à l'ADN polymérase pour réaliser l'élongation (extension) du brin d'ADN en utilisant le brin hybridé à l'oligonucléotide comme matrice à copier. Ainsi, le primer P1 hybridé au brin (+) permettra la synthèse d'un brin (-) complémentaire.

Le primer P2 hybridé au brin (-) permettra la

synthèse d'un brin (+) complémentaire. Cette suite de réactions représente un cycle d'amplification que l'on peut résumer en trois étapes :

- \* une dénaturation à 92-100°C, permettant une séparation physique de tous les brins d'ADN complémentaires,
- \* une hybridation des primers à une température qui leur est spécifique, soit de 37 à 65°C,
- \* une élongation du brin d'ADN par l'ADN polymérase à sa température optimale de fonctionnement, soit de 70 à 80°C pour la Taq polymérase (ADN polymérase thermorésistante extraite à partir de *Thermus aquaticus*).

Il est important de noter que chaque brin d'ADN néosynthétisé peut servir de matrice à l'ADN polymérase lors du cycle suivant. Il en résulte une amplification exponentielle de la quantité de fragment considérée, suivant la formule  $Y = (1 + X)^n$ , où Y est le facteur total d'amplification, n le nombre total de cycles d'amplification et X la moyenne sur n cycles de l'efficacité par cycle d'amplification, tel que si la quantité d'ADN à amplifier est égale à A, la quantité d'ADN après n cycles d'amplification est égale à  $A(1+X)^n$ .

Un appareil décrit dans la Demande EP-A2-0 236 069 (CETUS) est basé sur cette technique, qu'il vise à automatiser sous contrôle d'un ordinateur, puisque son exécution manuelle est très longue (2 à 5 heures) et fastidieuse.

L'appareil CETUS permet de soumettre de façon cyclique (jusqu'à 100 cycles environ) un nombre donné d'échantillons biologiques à amplifier du type évoqué plus haut (notamment contenus dans un lot de 48 tubes d'essai de 0,5 ml chacun) aux différentes températures définissant les trois phases précitées (dénaturation/hybridation/élongation). La température de chaque étape et le temps d'incubation des échantillons à chaque température sont déterminés par l'expérimentateur.

Les échantillons sont placés dans un récepteur fixe à l'intérieur duquel circule un liquide thermorégulé.

Un transfert d'énergie thermique se fera alors entre ce liquide circulant et l'échantillon biologique. Deux exemples sont proposés dans la Demande de Brevet CETUS précitée pour la réalisation technique de cet appareil :

- 5 i) le récepteur est en relation avec une pompe à effet Peltier (chauffage et refroidissement), elle-même en relation avec un réservoir,
- ii) le récepteur est en relation, par l'intermédiaire d'un système de valves automatiques, avec deux ré-  
10 servoirs contenant un liquide thermorégulé.

Toutefois, l'appareil CETUS présente un certain nombre de limitations :

- 1) Le lot d'échantillons étant immobile, c'est un  
15 liquide thermorégulé qui permettra d'atteindre la température souhaitée pour les échantillons. Ce liquide, à une température donnée, circule d'un réservoir de stockage ou d'une pompe à effet Peltier jusqu'au récepteur portant les échantillons. La cir-  
20 culation ayant lieu dans des conduits non-thermorégulés, la température du liquide est modifiée et ne correspond plus à la température initiale au départ du réservoir ou de la pompe.
- 2) Le transfert thermique entre le liquide thermorégulé et l'échantillon biologique doit se faire à travers  
25 trois barrières physiques : la paroi du récepteur des tubes, une fine pellicule d'air et la paroi du tube contenant l'échantillon. Il en résulte une inertie thermique et des pertes thermiques importantes.
- 3) Le remplacement d'un liquide à une température (T1) par  
30 un liquide à une autre température (T2, avec  $[T1-T2]$  pouvant atteindre 60°C) demande un temps non négligeable, qui augmente encore l'inertie du système.
- 4) La température réelle de l'échantillon est inconnue.
- 5) Cet appareil permet de traiter automatiquement un  
35 nombre donné (48 tubes de 0,5 ml) d'échantillons (un

lot d'échantillons) dans des conditions précises de températures. Cependant, les échantillons d'un lot seront tous traités de manière identique, c'est-à-dire dans les mêmes conditions de température, de temps à chaque température et de nombre total de cycles. En d'autres termes, tous les échantillons sont solidaires et traités de manière identique.

- 6) Le traitement automatique d'un second lot d'échantillons à la suite du premier lot est impossible.
- 7) L'immobilité totale des échantillons ne permet pas de déplacer un lot entier d'échantillons, ou une partie de lot, pour le présenter à un appareil de mesure ou de modification de l'échantillon.

Ces limitations ont les conséquences suivantes :

- A) Les pertes thermiques (limitations 1 et 2) inhérentes à la conception même de l'appareil CETUS, ont des conséquences graves au niveau de la thermorégulation du liquide. Cette perte de contrôle de la température du liquide circulant a des conséquences évidentes sur la température réelle atteinte par l'échantillon. La température programmée sur l'appareil est celle du réservoir de stockage (ou de la pompe à effet Peltier) du liquide et non la température réelle créée autour du tube contenant l'échantillon. Ce problème peut avoir de graves conséquences pour l'amplification PCR en particulier pour la température permettant l'hybridation des primers qui doit être déterminée avec précision (expérimentalement ou par le calcul).

- B) L'inertie thermique (limitations 2 et 3) va à l'encontre d'un changement rapide de température souhaité pour l'amplification PCR.

- C) Le fait de ne pas connaître la température réelle de l'échantillon (limitation 4) est particulièrement problématique avec un système ayant une inertie thermique et des pertes thermiques importantes. Notamment, les données publiées dans la littérature scientifique et technique ne sont pas directement utilisables: les températures publiées sont en effet les

températures réelles. De plus, sans la connaissance de la température réelle, il est impossible de comparer les résultats de différentes expériences.

D) Le traitement strictement identique de tous les échantillons (limitation 5), ainsi que l'impossibilité de traiter automatiquement plusieurs lots d'échantillons (limitation 6) ont des conséquences très graves pour l'amplification par PCR. En effet, l'application essentielle de l'amplification PCR se situe dans le domaine du diagnostic. Dans la grande majorité des cas (maladies infectieuses) il est indispensable de connaître la concentration (en séquences d'ADN) du pathogène à détecter. Cette concentration est en effet directement liée, d'une part, au pouvoir infectieux du prélèvement biologique et, d'autre part, à la gravité et au stade d'avancement de la maladie. Malheureusement, une telle quantification (la détermination de la concentration en séquences d'ADN spécifique) est très délicate après amplification spécifique des séquences à détecter. Cette difficulté est liée à deux facteurs :

- la complexité des courbes d'amplification qui atteignent un plateau,
- le fait que ces courbes soient différentes en fonction de la concentration initiale en fragment à amplifier.

La seule solution permettant une quantification précise, sur 40 cycles par exemple, est de suivre la cinétique d'accumulation du fragment amplifié. En d'autres termes, il faudrait connaître pour chaque échantillon la concentration de fragment amplifié après 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 et 40 cycles.

Or, il est parfaitement impossible de suivre automatiquement une telle cinétique avec l'appareil CETUS puisque les 48 échantillons d'un lot sont traités dans des conditions identiques et qu'un seul lot peut être traité automatiquement. Il en résulte que le traitement automatique des échantillons par cet appareil ne permet pas de

faire une quantification, qui est très souvent indispensable.

E) Les tubes contenant les échantillons ne peuvent pas être déplacés pour les présenter à un appareil de mesure ou de modification de l'échantillon (limitation 7) ..

5 En fait, au cours ou en fin d'amplification, il peut être intéressant de connaître certains paramètres, comme par exemple :

- la densité optique à 260 nm , permettant de calculer la concentration de l'ADN, donc d'avoir une idée du taux  
10 d'amplification instantané;
- le pH , permettant de réajuster celui-ci à la valeur optimale pour l'ADN polymérase.

De plus, il peut être utile d'effectuer certaines modifications sur l'échantillon avant ou après l'amplification

15 PCR, par exemple :

- amplification de séquences d'ARN (VIH responsable du SIDA) : une première étape consiste à copier le brin d'ARN en un brin d'ADN complémentaire à l'aide d'une  
20 réverse transcriptase, pour ajouter ensuite dans l'échantillon les éléments nécessaires pour l'amplification PCR ;
- amplification PCR + amplification par la RNA polymérase des bactériophages T7 ou SP6 : après une amplification PCR, une seconde amplification peut être faite en utilisant une autre enzyme (RNA polymérase) et d'autres réactifs (nucléotides triphosphate) qu'il faut ajouter dans le  
25 milieu réactionnel ;
- amplification PCR + hybridation en milieu liquide : après amplification PCR, une (ou plusieurs) sonde nucléique spécifique(s) du fragment amplifié est(sont) ajoutée(s) au milieu  
30 réactionnel ; l'échantillon est alors incubé à une température permettant l'hybridation de la sonde. .

La présente invention a donc pour but de pourvoir à un appareil d'exécution automatique de séquences d'acides nucléiques qui répond mieux aux nécessités de la pratique  
35 que les appareils visant au même but antérieurement connus, notamment en ce que :

- les pertes thermiques entre le lieu de chauffage (refroidissement) et le lieu d'utilisation (environnement des tubes) n'existent pas puisque le chauffage et l'utilisation se font dans le même lieu. Ainsi, la température programmée par l'utilisateur sera réellement celle de l'environnement des tubes. Les tubes contenant les échantillons trempent directement dans un bain à huile thermostaté, limitant ainsi les barrières physiques, entre l'huile et l'échantillon, à la seule paroi du tube (cf. limitation précitée 2). Un robot déplace un portoir de 48 tubes de 1,5 ml (par exemple) entre les différents bains à huile. Le temps nécessaire pour changer de bain est compris entre 3 et 5 secondes, rendant négligeables les variations de température de l'échantillon pendant le déplacement,
- la température réelle de l'échantillon sera mesurée par une sonde positionnée directement dans un tube. Cependant, cette sonde ne sera disponible qu'en option sur l'appareil objet de la présente invention,
- 20 - le point fort de cet appareil est de permettre une quantification en suivant la cinétique d'accumulation du fragment amplifié. Contrairement à l'appareil CETUS, les différents échantillons d'un même lot peuvent être traités dans différentes conditions d'amplification, c'est-à-dire en particulier avec un nombre de cycles différent. Il suffit pour cela d'utiliser un portoir de tubes composé de plusieurs éléments indépendants, le robot pouvant arrêter l'amplification pour un seul élément alors que les éléments restant continuent les cycles d'amplification. Le suivi automatique de la cinétique peut également se faire par traitement successif de plusieurs lots d'échantillons : le premier lot subissant 4 cycles, le second 8 cycles, etc...,
- le robot peut présenter un lot ou une partie de lot à un
- 35 appareil de mesure ou de modification de l'échantillon.



De façon plus précise, la présente invention a pour objet un appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique en plusieurs étapes successives pour le traitement d'une pluralité d'échantillons biologiques, caractérisé en ce qu'il comporte :

- un premier bloc calorifugé,
  - une pluralité de cuves thermostatiques indépendantes ménagées dans ce bloc calorifugé, qui sont équipées chacune d'un élément chauffant,
- 10 - une pluralité de portoirs de support d'une pluralité de tubes contenant les échantillons précités, chaque portoir étant équipé de pieds d'appui et d'oreilles de préhension et étant destiné à être immergé successivement dans la pluralité de cuves thermostatiques précitées,
- 15 - un robot de transfert successif des portoirs, équipés des tubes d'échantillons, d'une cuve thermostatique à la suivante, lequel robot comporte un bras de manoeuvre équipé d'une pince de préhension de chaque portoir par l'intermédiaire de ses oreilles précitées,
- 20 - un dispositif de régulation électronique de la température de chaque cuve,
- un ordinateur de commande du robot et du dispositif de régulation électronique des températures des cuves en fonction du cycle thermique précité, les températures des cuves
- 25 et le temps d'incubation dans chaque cuve ainsi que l'ordre de transfert des différents portoirs et le nombre de cycles auxquels sont soumis les échantillons de chaque portoir étant pilotés par cet ordinateur.

L'appareil selon l'invention est avantageusement applicable à l'exécution de la technique PCR décrite plus haut, à savoir de l'amplification enzymatique in vitro de séquences d'acides nucléiques. En outre, les cuves thermostatiques peuvent être constituées, soit par des cuves remplies chacune d'un fluide échangeur de chaleur, définissant un bain thermostatique et coopérant avec un dispositif

d'agitation pour homogénéiser la température du bain correspondant, soit par des cuves thermostatiques simples sans fluide échangeur de chaleur.

L'appareil selon l'invention peut être avantageusement équipé d'un deuxième bloc calorifugé comportant au moins une cuve réfrigérée à 4°C et destinée à stocker les portoirs avant et/ou après traitement thermique complet des échantillons correspondants.

Selon une variante avantageuse de cette disposition, le bloc réfrigéré est remplacé par un simple plateau de stockage.

La hauteur des premier et deuxième blocs calorifugés est fonction de celle des portoirs, qui peuvent y être disposés superposés.

En outre, une sonde thermique peut être solidaire de la pince du robot et coopère avec un tube témoin de chaque portoir.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 est une illustration schématique de deux cycles d'amplification enzymatique de séquences d'acides nucléiques selon la technique PCR, déjà décrite plus haut,

- la figure 2 est une vue en perspective de l'appareil selon l'invention,

- la figure 3 est une vue de dessus de l'appareil de figure 2 représenté sur un plan de travail,

- la figure 4 est une vue du portoir utilisé dans l'appareil conforme à l'invention, qui y est représenté développé à plat.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces dessins et les parties descriptives correspondantes, sont

10

donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

L'appareil automatique selon l'invention se compose de quatre parties principales :

- un bloc thermostaté 1,
- un robot 4,
- un bloc réfrigéré 3,
- un ordinateur de commande piloté par son logiciel.

10 Le bloc thermostaté 1 qui est calorifugé, se compose de trois bains thermostatiques 5, 6 et 7 à huile équipés chacun d'un dispositif de chauffage/régulation de température réglable individuellement dans la plage : température ambiante - 100°C.

15 Chaque bain est donc constitué d'une cuve remplie d'un fluide échangeur de chaleur, d'un élément chauffant, d'une sonde de mesure de température et d'un système d'agitation qui permet d'homogénéiser la température du fluide.

20 Une mousse en matière plastique assure l'isolation thermique entre cuves et limite les déperditions calorifiques vers l'extérieur.

Un dispositif de régulation électronique de température de chaque cuve est intégré dans un boîtier de commande 2. La fixation des points de consigne et l'affichage des températures réelles sont obtenues, soit grâce à un boîtier de commande indépendant, soit grâce à l'ordinateur de commande.

30 Le robot 4, qui est d'un type connu en soi, comporte un bras de manoeuvre 8 équipé d'une pince comprenant deux doigts de préhension 10.

Il assure le transfert des portoirs 11 contenant les tubes d'échantillons (20 à 100 tubes par portoir) d'un bain thermostaté à l'autre.

35 Une sonde thermique 20, solidaire de la pince

permet de connaître la température dans un tube témoin du portoir 11.

Sa pince a été adaptée pour que l'opération de préhension du portoir se fasse à l'ouverture, comme il  
5 est précisé plus loin..

Le bloc réfrigéré 3 est analogue au bloc thermostatique, 1 mais ne comporte qu'une seule grande cuve 9 réfrigérée à 4°C et destinée à recevoir les portoirs neufs et les portoirs après traitement, en bloquant toute réaction biologique.  
10

Cette cuve est plus profonde que celles qui sont utilisées dans le bloc thermostatique, car elle peut contenir des portoirs superposés sur deux étages.

La source de froid est obtenue grâce à un groupe frigorifique de type connu ou une cellule à effet Peltier de type connu.  
15

Le bloc réfrigéré peut être remplacé par un simple plateau de stockage.

L'ordinateur de commande utilisé est un micro-ordinateur de type connu.  
20

Le logiciel de commande gère le fonctionnement complet de l'automate, il permet notamment :

- l'affichage et la mise en place des points de consigne des températures de chaque bain thermostatique,
- 25 - l'affichage de la température réelle de chaque bain,
- la programmation du temps de présence d'un portoir dans une cuve,
- la fixation du nombre de cycles thermiques pour un portoir,
- 30 - la détermination de l'ordre de passage, dans les différents bains, de chaque portoir,
- le fonctionnement continu, sans intervention manuelle, pour le nombre de portoirs qui a été fourni à l'automate,
- la programmation d'un arrêt momentané du fonctionnement
- 35 de l'automate pour réaliser une opération manuelle (par exemple ajout de réactif ou prélèvement pour analyse).

Chaque portoir 11, montré en détail à la figure 4, comporte une plaque perforée 12 comportant 49 (7 X 7) orifices 13, dont 48 orifices sont destinés à recevoir les tubes contenant des échantillons de séquences d'acides nucléiques 5 à soumettre à l'amplification enzymatique PCR par passage successif, à l'aide du robot 4 et sous contrôle de l'ordinateur 30 (associé à une imprimante 40 et à un écran 50), dans les trois cuves thermostatiques 5 à 7 dans lesquelles ont respectivement lieu les étapes de dénaturation, hybridation et élongation décrites plus haut.

Dans le 49-ème orifice, 13a, qui se trouve en position centrale dans la plaque 12, est disposé un tube témoin destiné à recevoir, le cas échéant, la sonde thermique 20 précitée solidaire de la pince 9 du robot.

Le portoir 11 comporte des pieds (ou pattes) 14 qui sont illustrées en pointillé à l'état développé à la figure 4 et qui sont perpendiculaires au plan de cette figure et dirigés vers le bas. Ces pieds 14 sont équipés de tétons de centrage 15 permettant un positionnement précis du portoir dans chaque cuve ou sur le couvercle (non représenté et qui est décrit ci-après) d'un portoir inférieur en tenant compte du fait que la profondeur de la cuve 3 est telle qu'elle permet de gerber les portoirs.

Deux oreilles de préhension 18, perpendiculaires au plan de la figure 4 et dirigées en sens opposé aux pattes 14, à savoir vers le haut, permettent aux doigts 10 de la pince du robot de transférer les portoirs d'une cuve à l'autre. A cet effet, chaque oreille 18 comporte deux orifices 21 dans lesquels sont introduits deux ergots portés par chaque doigt 10.

La plaque 12, ainsi que les pattes 14, peuvent comporter des évidements d'allègement, tels que ceux indiqués par les références numériques 16 et 17.

Les orifices 19 sont destinés à recevoir les tétons de centrage 15 d'un portoir supérieur lorsque deux portoirs sont superposés dans la cuve 3.

Chaque plaque 12 est destinée à coopérer avec un couvercle, qui n'a pas été représenté car il est constitué par une plaque identique à la plaque 12, sauf le fait qu'il est dépourvu de pattes et d'oreilles. Ce couvercle est  
5 appliqué sur les tubes placés dans la plaque 12 et est maintenu pressé contre les bouchons des tubes à l'aide de quatre languettes 22 portées par les deux côtés de la plaque 12 sur lesquels sont ménagées les oreilles de pré-  
hension 18 et repliées vers l'intérieur de la plaque 12  
10 parallèlement à celle-ci. De cette manière est assuré le positionnement rigoureux des tubes contenant les échantillons à amplifier, évitant ainsi qu'ils remontent sous l'effet de la poussée d'Archimède lorsqu'ils sont immergés dans un bain thermostatique ou que les bouchons des tubes  
15 s'ouvrent sous l'effet de la pression de l'échantillon.

Il va de soi que la configuration générale du portoir de la figure 4 est susceptible d'être adaptée à différents types de tubes à essai pour échantillons.

De plus, il est possible d'utiliser une pluralité  
20 de portoirs de dimensions réduites, chacun pourvu de ses propres pattes de positionnement et de ses propres oreilles de préhension et que l'on peut imaginer obtenir à partir de la plaque 12 en subdivisant celle-ci en plaques élémentaires. Ceci permet de faire suivre aux échantillons de certains  
25 portoirs élémentaires juxtaposables un processus différent de celui des autres portoirs élémentaires.

L'appareil automatique dont on vient de décrire les composants assure donc le transfert des portoirs de tubes d'échantillons dans trois bains thermostatés à tempé-  
30 rature réglable pour qu'ils puissent y subir de façon répétée le traitement thermique cyclique en trois étapes successives.

Cet appareil est donc parfaitement adapté à la technique d'amplification PCR et permet, d'une part, de résoudre les problèmes essentiels posés par l'appareil CETUS  
35 décrit plus haut et, d'autre part, d'assurer un traitement

automatique d'un nombre élevé d'échantillons, notamment 250 à 300 tubes de 1,5 ml environ et plus de 500 tubes de 0,5 ml.

La température des bains, le temps d'incubation dans les bains, l'ordre de passage des différents portoirs 5 et le nombre de cycles d'amplification sont programmables.

En particulier, les températures des bains peuvent évoluer automatiquement pendant une expérience et le changement de cuve peut être non seulement programmé dans le temps, mais aussi en fonction de la température d'échantil- 10 lon grâce à la sonde thermique de mesure de température associée à chaque portoir.

Une zone de stockage (bloc réfrigéré) permet de placer les portoirs avant et après passage dans les cuves thermostatiques, et assure un fonctionnement automatique 15 sans intervention humaine pour 3 à 5 portoirs.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention le se limite nullement à ceux de ses modes de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, 20 toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention. En particulier, il y a lieu de noter que les domaines d'application de l'appareil selon l'invention sont en général constitués par tous ceux 25 où il est nécessaire d'avoir une température constante (et éventuellement réglable suivant les besoins) pendant un temps donné. Il s'agit donc essentiellement des réactions enzymatiques et des techniques d'hybridation ADN/ADN, ARN/ARN, et ADN/ARN et en général de toutes les techniques 30 dans lesquelles une pluralité d'échantillons biologiques doit être soumise de façon répétée à un cycle thermique en plusieurs étapes successives, la technique PCR visée dans la description qui précède n'étant donc pas limitative.

REVENDECATIONS

- 1.- Appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique comprenant plusieurs étapes successives pour le traitement d'une pluralité d'échantillons biologiques, caractérisé en ce qu'il comporte :
- un premier bloc calorifugé (1),
  - une pluralité de cuves thermostatiques indépendantes (5, 6, 7) ménagées dans ce bloc calorifugé (1), qui sont équipées chacune d'un élément chauffant,
  - 10 - une pluralité de portoirs (11) de support d'une pluralité de tubes contenant les échantillons précités, chaque portoir (11) étant équipé de pieds d'appui (14) et d'oreilles de préhension (18) et étant destiné à être immergé successivement dans la pluralité de cuves thermostatiques précitées (5, 6, 7),
  - 15 - un robot (4) de transfert successif des portoirs (11), équipés des tubes d'échantillons, d'une cuve thermostatique à la suivante, lequel robot (4) comporte un bras de manoeuvre (8) équipé d'une pince (10-10) de préhension de chaque
  - 20 portoir (11) par l'intermédiaire de ses oreilles précitées (18),
  - un dispositif de régulation électronique de la température de chaque cuve (5, 6, 7),
  - un ordinateur de commande du robot et du dispositif de
  - 25 régulation électronique des températures des cuves en fonction du cycle thermique précité, les températures des cuves et le temps d'incubation dans chaque cuve ainsi que l'ordre de transfert des différents portoirs et le nombre de cycles auxquels sont soumis les échantillons de chaque
  - 30 portoir étant pilotés par cet ordinateur.
- 2.- Appareil selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est équipé d'un deuxième bloc calorifugé (3) comportant au moins une cuve (9) réfrigérée à 4°C et destinée à stocker les portoirs (11) avant et/ou après traitement
- 35 thermique complet des échantillons correspondants.



3.- Appareil selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est équipé d'un plateau de stockage des portoirs.

4.- Appareil selon la revendication 2, caractérisé en ce que la cuve réfrigérée (3) présente une hauteur double 5 de celle de la cuve thermostatée (1) pour y gerber plusieurs portoirs (11) avant et/ou après traitement thermique des échantillons.

5.- Appareil selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4, caractérisé en ce qu'au moins un portoir 10 se compose de plusieurs portoirs élémentaires indépendants juxtaposables.

6.- Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 ou 5, caractérisé en ce qu'une sonde thermique (20) est solidaire de la pince du robot (4) et coopère avec un 15 tube témoin de chaque portoir (11).

7.- Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le premier bloc calorifugé (1) comporte trois cuves thermostatiques (5, 6, 7) et le cycle thermique correspond à l'exécution de l'amplifica- 20 tion enzymatique in vitro de séquences d'acides nucléiques.

8.- Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 ou 7, caractérisé en ce que les cuves (5, 6, 7) du premier bloc calorifugé (1) sont remplies d'un fluide échangeur de chaleur définissant un bain thermostatique et sont 25 équipées, en outre, d'un dispositif d'agitation permettant d'homogénéiser la température de la cuve correspondante.

1/4

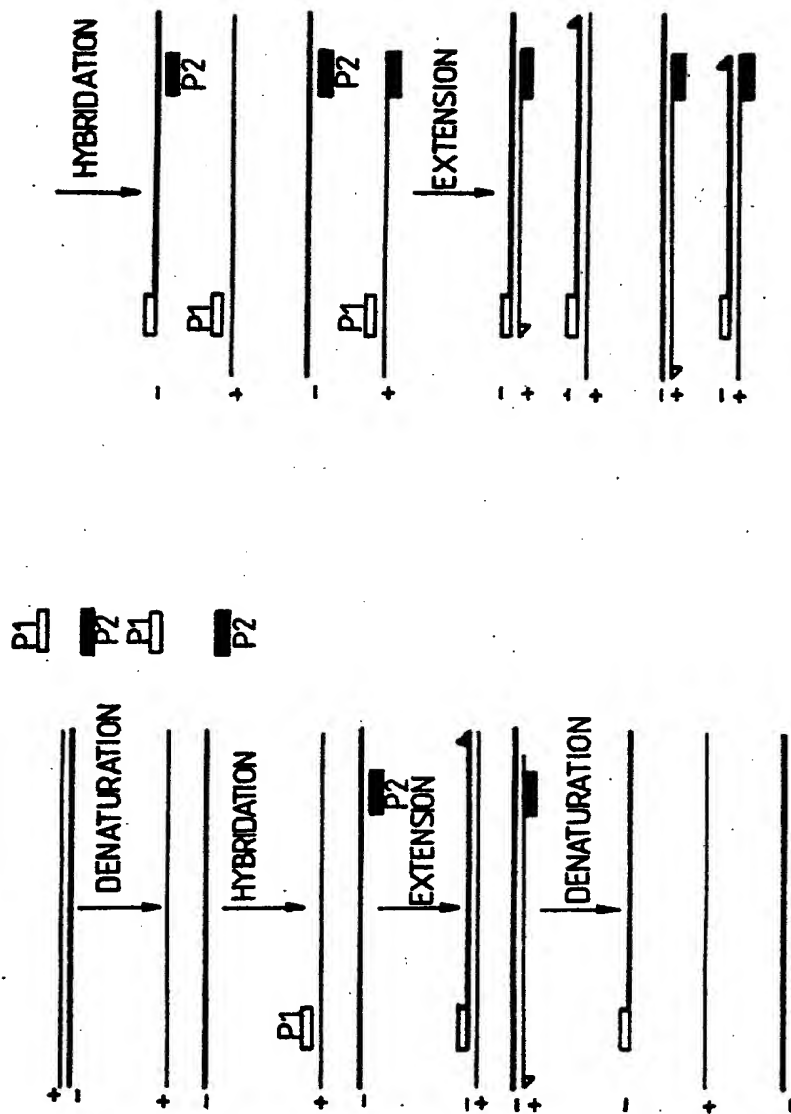
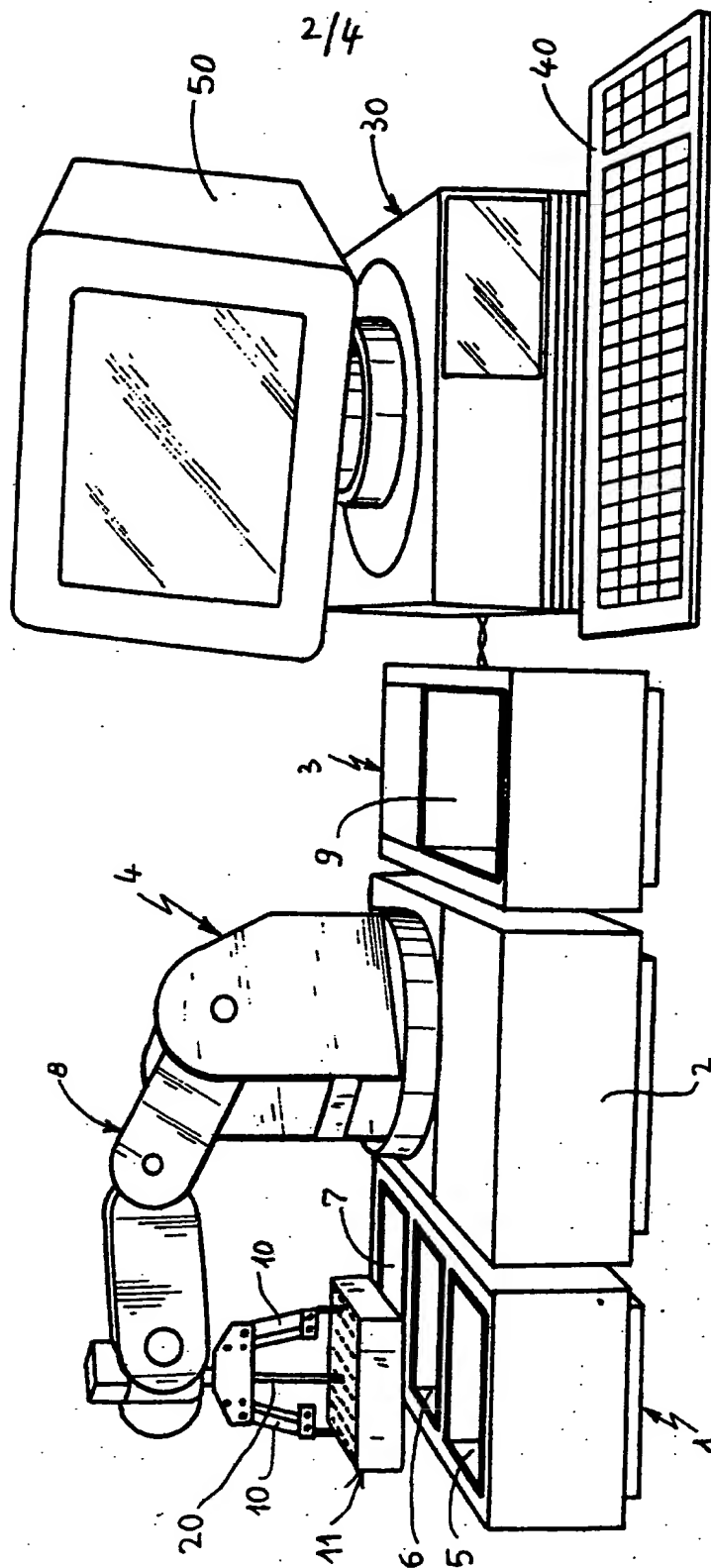
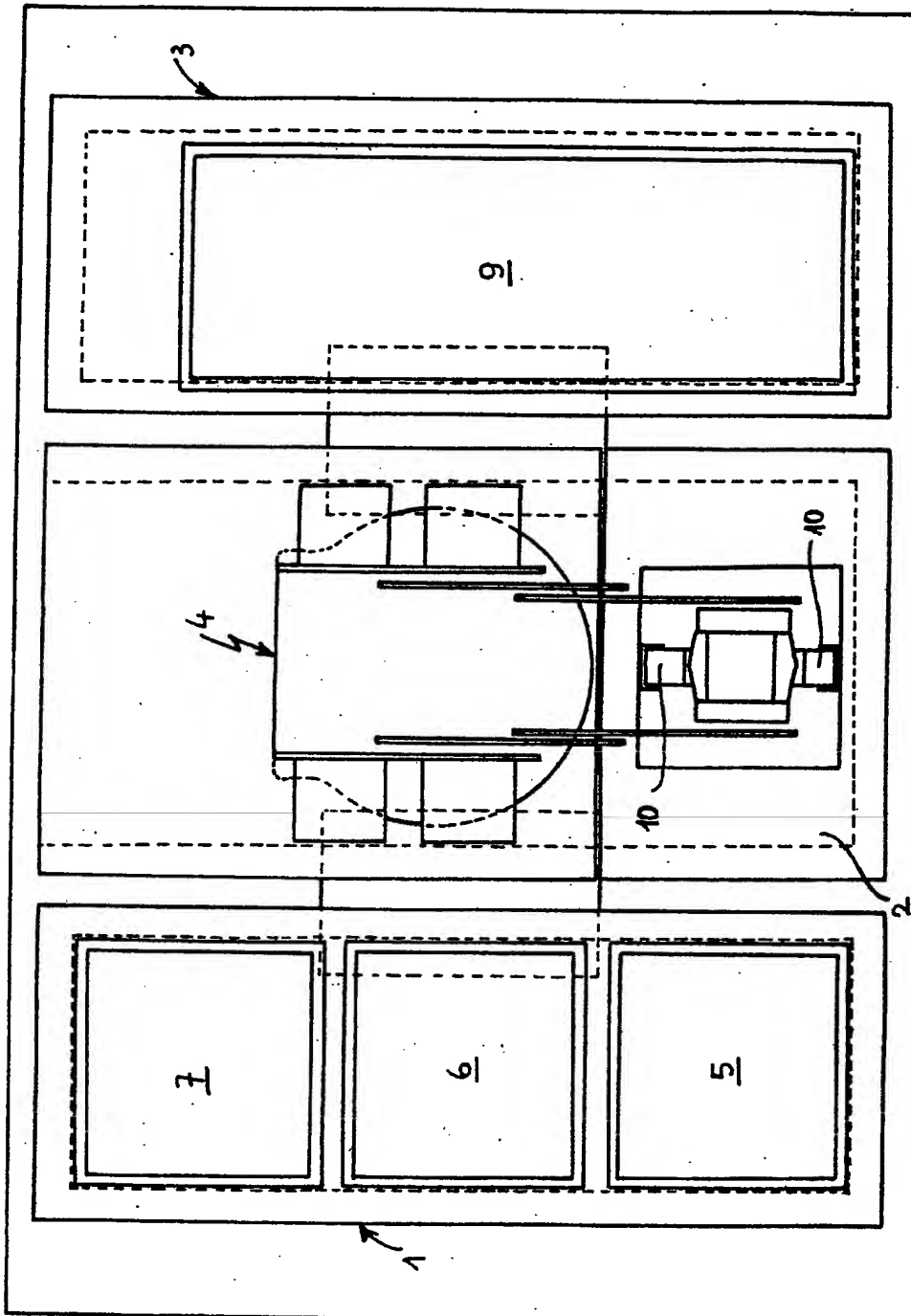


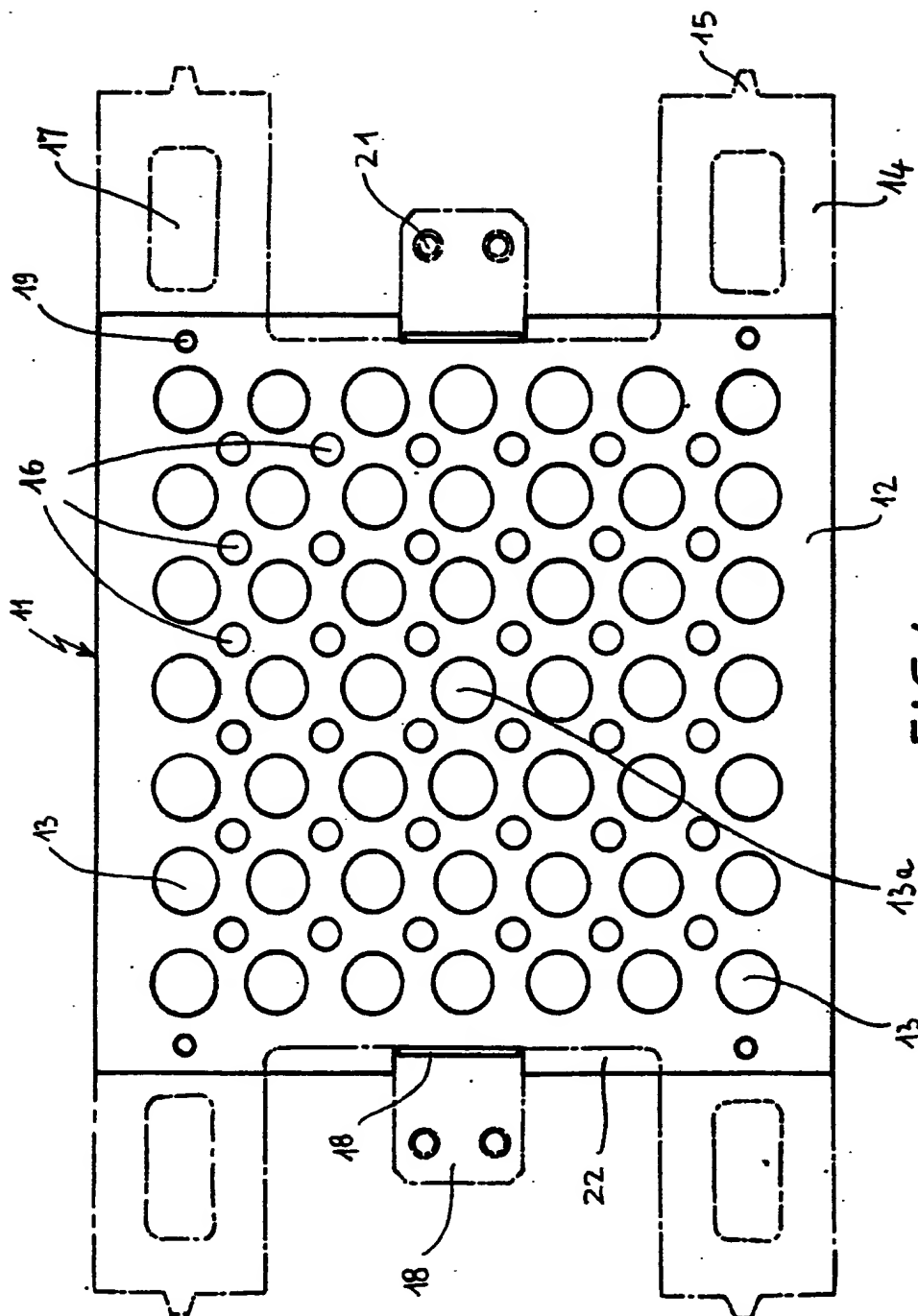
FIG.1

FIG. 2

3/4



**FIG. 3**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**